بررسی اثرات ضدتشنجی، خواب‌آوری و شل‌کنندگی عضلانی کربنوکسولون، ماده موثره سنتتیک از گیاه شیرین بیان در موش

مرجان نصیری اصل[۱]، حسین حسین زاده[۲*]

۱- دستیار تخصصی فارماکولوژی، دانشکده پزشکی مشهد
۲- دانشیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی و دانشکده داروسازی مشهد
*آدرس مکاتبه: دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، بخش فارماکودینامی و سم شناسی
صندوق پستی: ۹۱۷۷۵-۱۳۶۵، نمابر: ۸۶۲۳۲۵۱ (۰۵۱۱)
پست الکترونیک: hosseinzadehh@yahoo.com

چکیده

در این مطالعه اثرات ضدتشنجی، خواب‌آوری و شل‌کنندگی عضلانی کربنوکسولون، ماده موثره سنتتیک از گیاه شیرین بیان در موش سوری بررسی شد. در آزمون پنتیلن تترازول، ED_{50} دیازپام و کربنوکسولون به ترتیب (۱/۴۴ و ۰/۸۹ : CL ۹۵٪) mg/kg ۱/۱۳ و (۵۵۶/۲۹ و ۱۴۴/۲۷ :CL ۹۵٪) mg/kg ۲۸۳/۳ به دست آمد. در آزمون پنتیلن تترازول کربنوکسولون در دوزهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست سبب افزایش زمان شروع تشنج و کوتاهتر شدن مدت زمان تشنج شود. اثر ضدتشنجی کربنوکسولون مشابه دیازپام با دوز mg/kg ۰/۵ بود. در آزمون الکتروشوک کربنوکسولون با دوز mg/kg ۴۰۰ سبب کاهش مدت زمان تشنج شد و اثر محافظتی در برابر تشنج ایجاد کرد لیکن اثر محافظتی در برابر مرگ و میر پایین بود. در مطالعه اثرات خواب‌آوری، کربنوکسولون در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست مدت زمان خواب ناشی از پنتوباربیتال را به صورت وابسته به دوز افزایش دهد. همچنین زمان شروع خواب را نیز در دوزهای یاد شده به صورت وابسته به دوز کاهش داد.

در مطالعه اثرات شل‌کنندگی عضلانی کربنوکسولون در آزمون عدم گرفتن میله (Traction test) این اثر تنها در دوز mg/kg ۴۰۰ توانست با اختلاف معنی‌دار نسبت به کنترل منفی اثر شل‌کنندگی عضلانی را نشان دهد و در آزمون Rotarod کربنوکسولون توانست به صورت وابسته به دوز در دوزهای mg/kg ۳۰۰ - ۱۰۰ سبب کاهش مدت زمان باقی ماندن حیوان بر میله چرخان شتاب‌دار گردد.

این نتایج نشان می‌دهد که کربنوکسولون دارای اثرات ضدتشنجی، خواب‌آوری و شل‌کنندگی عضلانی است و احتمالاً در صرع کوچک و بزرگ می‌تواند موثر باشد.

گل واژگان: کربنوکسولون، اثرات ضدتشنجی، خواب‌آوری، شل‌کنندگی عضلانی، شیرین بیان، گیاهان دارویی

مقدمه

گیاه شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* L. از خانواده Papilionaceae به صورت علفی و پایا در مدیترانه، آسیای میانه و اروپا می‌روید [۲۲]. در ایران در مزارع استان‌های فارس و لرستان به فراوانی یافت می‌شود. این گیاه دارای طیف وسیعی از اثرات فارماکولوژیکی است که از آن جمله می‌توان به اثرات ضدالتهابی، خواب‌آوری، ضدسرفه، محافظت کبدی [۱۰، ۳۳]، آنتی‌اولسر [۲۹]، آنتی‌دوتی [۲۰]، آنتی‌آلرژیک و درمان کننده هپاتیت ویروسی [۱،۲۳، ۲٤] و تنظیم کنندگی فعالیت سیستم ایمنی [۱۷] اشاره کرد [۱٤، ۱۸].

بخش عمده‌ای از فعالیت‌های اشاره شده از عصاره گیاه شیرین بیان را به آگلیکون ساپونینی β- گلیسریتینیک اسید نسبت می‌دهند. گلیسریتینیک اسید ساختمان شبه استروییدی دارد و مشتق سنتتیک آن به نام کربنوکسولون می‌باشد امروزه در درمان اولسر معده و دئودنوم مطرح است [۲۹].

کربنوکسولون دارای اثرات فارماکولوژیکی متعددی است که از جمله می‌توان به القا پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP70) [۲۱]، مهار آنزیم ۱۱ - بتا هیدروکسی استروییید دهیدروژناز (11-β-HSD) [۱۳] و مهار کانال‌های Gap junction اشاره کرد [٦].

از آنجا که کانال‌های Gap junction (GJ) به عنوان سیناپس‌های الکتریکی میان نورون‌های مغزی نقش مهمی را در هماهنگ سازی اعمال مغزی پدید می‌آورند و با توجه به اینکه صرع یک هماهنگی غیرطبیعی میان نورون‌ها است و در گذشته پاتوژنز صرع تنها بر پایه انتقال عصبی سیناپس‌های شیمیایی مطرح می‌شد، در مطالعات انجام گرفته نقش این کانال‌ها مطرح شده است [٤]. به طوری که این کانال‌ها در تولید امواج خیلی سریع در EEG با فرکانس بزرگتر از ۷۰ هرتز در قبل از حمله و احتمالاً در شروع صرع مطرح شده است [۲۸].

در مطالعات برون‌تنی کربنوکسولون از طریق مهار کانال‌های GJ سبب نابودی کامل یا جزیی اسپایک‌های اکتوپیک تولید شده توسط ٤- آمینو پیریدین در ناحیه CA3 هیپوکامپ رت [۹] و همچنین تضعیف تشنج در ناحیه CA1 [۲۵] می‌شود. بنابراین برای اثبات این اثر در شرایط درون‌تنی اثر ضدتشنجی آن در موش سوری مورد مطالعه قرار گرفت و از مدل‌های تشنجی الکتروشوک و پنتیلن تترازول استفاده شد. همچنین اثرات خواب‌آوری و شل‌کنندگی عضلانی این ماده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

ملح دی سدیم کربنوکسولون و پنتیلن تترازول از سیگما و دیازپام به صورت آمپول از شرکت دارویی داروپخش تهیه شد. انحلال داروها در نرمال سالین صورت گرفته و در دوزهای مورد نظر به صورت i.p. به حیوانات تزریق شد.

حیوان

موش نر BALB/c با محدوده وزنی ۳۰-۲۵ گرم که در اتاق حیوانات مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی مشهد پرورش یافته بودند مورد استفاده قرار گرفت. این حیوانات در سیکل روشنایی/ تاریکی ۱۲/۱۲ ساعت در دمای ۲ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری گردیدند.

فعالیت ضدتشنجی

الف- آزمون تشنجی پنتیلن تترازول

کربنوکسولون و دیازپام به ترتیب یک ساعت و ۳۰ دقیقه قبل از تجویز پنتیلن تترازول

(۹۰ mg/kg, i.p.) به صورت داخل صفاقی به گروههای ۷ تایی موش تزریق شد. زمان شروع تشنجات کلونیک و مدت زمان تشنج، محافظت در برابر تشنج و محافظت در برابر مرگ و میر گزارش گردید [۳۲].

ب- آزمون الکتروشوک

تحریکی با جریان متناوب ۵۰ هرتز و ۱۵۰ میلی‌آمپر به مدت ۰/۲ ثانیه از طریق الکترودهایی که به گوش حیوان وصل شده بود، ایجاد شد. قبل از اتصال الکترودها گوش‌های حیوان با محلول نمکی ۰/۹ درصد خیس گردید. مدت زمان کشش اندام‌های عقبی بدن حیوان و درصد حفاظت از مرگ و میر و تشنج گزارش گردید [۳۲]. ترتیب زمانی تجویز کربنوکسولون و دیازپام همانند آزمون پنتیلن تترازول بود و به گروه‌های ۷ تایی موش به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

ج- بررسی اثرات خواب‌آوری

افزایش زمان خواب ایجاد شده توسط پنتوباربیتال با دوز (mg/kg, i.p. ۳۰) به عنوان خواب‌آور استفاده شد. در این روش گروه‌های ۱۰ تایی از موش استفاده شد. کربنوکسولون، نرمال‌سالین و دیازپام به صورت داخل صفاقی تزریق شد و سپس پنتوباربیتال به ترتیب ۶۰، ۶۰ و۳۰ دقیقه بعد تجویز شد. سپس حیوان به پشت روی یک سطح نرم و گرمی (۳۷ درجه سانتی‌گراد) گذاشته شد. حیوان در این مرحله به صورت کاملا آرام و با چشمان بسته (در یک خواب کاملاً آشکار) به نظر می رسید. از دست دادن بازتاب righting، بعد از پایان تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال آغاز شد (زمان صفر). زمان برگشت بازتاب، به عنوان مدت زمان خواب ثبت گردید و پایان آزمون زمانی ثبت گردید در شرایطی که سه بار به صورت پیاپی حیوان را به پشت خوابانده شد و حیوان توانست در ظرف کمتر از یک دقیقه برگشته و روی پنجه‌های پای خود بایستد. در بیشتر نمونه ها پس از ایستادن روی پنجه‌ها موش شروع به حرکت کرد [۵].

د- مطالعه اثر شل‌کنندگی عضلانی به روش عدم گرفتن میله (Traction Test)

برای انجام این آزمایش میله فلزی محکم، به طول ۴۰ سانتی‌متر و با قطری مناسب در حد ۲۳ میلی‌متر انتخاب شد به طوری که در حالت عادی موش توانایی گرفتن میله را داشت. این میله از دو طرف توسط گیره به پایه‌ها متصل شد. ارتفاع میله از سطح، نباید کمتر از ۳۰ سانتی‌متر باشد. در غیر این صورت موش‌ها تمایل به گرفتن میله را نداشته و به راحتی خود را رها می‌کنند. در این روش موش‌ها را از طریق دوتا پای خود از میله آویزان کرده و اگر بتواند در مدت ۵ ثانیه برگشته و بتواند میله را با دست‌های خود بگیرد مشخص می‌شود که ماده تجویزی اثر شل‌کنندگی نداشته است. پاسخ مثبت به اثر شل‌کنندگی به صورت از دست دادن توانایی حیوان در گرفتن میله با دست ظاهر می‌شود. آزمایش فوق فقط بر روی موش‌هایی انجام شد که قبل از تزریق بتوانند میله را با دست‌های خود در مدت ۵ ثانیه بگیرند. این کار جهت افزایش دقت و صحت آزمایش انجام می‌گیرد [۲۶]. کربنوکسولون ونرمال‌سالین و دیازپام به صورت داخل صفاقی به گروه‌های ۱۰ تایی موش تجویز شد و سپس به ترتیب ۶۰ و ۳۰ دقیقه بعد آزمایش انجام گرفت.

۵ ـ مطالعه فعالیت حرکتی و تعادلی با کمک میله چرخان شتابدار(Rotarod accelerating)

این مطالعه به کمک دستگاه (TSE Rotarod System) انجام پذیرفت. حیوان بر روی یک میله افقی به قطر ۳ سانتی‌متر در حال چرخش با سرعت اولیه ۱۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. سرعت نهایی میله از ۱۰ دور بر دقیقه به ۲۰ دور بر دقیقه در ظرف ۲۰ ثانیه افزایش یافت. مدت زمانی که هر حیوان قادر

به نگهداری تعادل و باقی ماندن بر روی میله در حال چرخش بود اندازه‌گیری شد. در این آزمون موش با حداکثر زمان ۳۰۰ ثانیه و در فواصل ۳۰ و ۶۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت [۱۹]. قبل از انجام آزمایش‌ها تنها از موش‌هایی که توانایی قرار گرفتن بر روی میله چرخان را به مدت حداقل ۳۰ ثانیه را داشتند استفاده شد. کربنوکسولون، نرمال سالین و دیازپام به ترتیب ۶۰، ۶۰ و ۳۰ دقیقه قبل از انجام آزمون به صورت داخل صفاقی به گروه‌های ۱۰ تایی از موش تجویز شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای انجام آزمون‌های آماری از برنامه کامپیوتری Instat و برای تعیین ED_{50} (دوزی از دارو که در ۵۰ درصد از حیوانات اثر ضدتشنجی داشته باشد) از برنامه آماری Litchfield and Wilcoxon با نرم‌افزار PCS استفاده شد. در بررسی اثرات ضدتشنجی داده‌ها به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد و آنالیز واریانس و سپس آزمون Tukey-Kramer گزارش گردید. نتایجی که دارای $P< ۰/۰۵$ بود به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد. در آزمون خواب‌آوری ابتدا آزمون ANOVA یک‌طرفه بر روی داده‌ها صورت گرفت. سپس چنانچه اختلاف بین انحراف استانداردها معنی‌دار بود، داده‌های خام را معکوس کرده یا به مقیاس لگاریتمی تبدیل شد و چنانچه اختلاف از بین رفت، آزمون Tukey-Kramer انجام شد. همچنین جهت آنالیز داده‌های غیر کمی مربوط به Traction test از آزمون فیشر (Fisher exact) دوطرفه استفاده گردید. در آزمون Rotarod بعد از آزمون ANOVA یک طرفه، آزمون دانت انجام شد.

نتایج

مطالعات اثرات ضدتشنجی

ED_{50} دیازپام و کربنوکسولون در آزمون پنتیلن تترازول به ترتیب (۱/۴۴ و ۰/۸۹ : CL ۹۵ درصد) ۱/۱۳ mg/kg و (۵۵۶/۲۹ و ۱۴۴/۲۷ : CL ۹۵ درصد) ۲۸۳/۳ mg/kg به دست آمد.

در تشنج ناشی از پنتیلن تترازول کربنوکسولون، در دوزهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب افزایش زمان شروع تشنج حاصل از پنتیلن تترازول شد. مدت زمان تشنج کاهش یافت که مشابه دیازپام با

جدول شماره ۱- اثر کربنوکسولون بر روی مدت زمان تشنج، زمان شروع تشنج و محافظت در برابر مرگ و میر ناشی از پنتیلن تترازول در موش سوری

درمان	دوز	زمان شروع تشنج (ثانیه)	مدت زمان تشنج (ثانیه)	محافظت در برابر تشنج (درصد)	محافظت در برابر مرگ و میر (درصد)
نرمال سالین	۱۰ ml/kg	۵۰/۸۳ ± ۸/۱۴	۲۵/۸۳ ± ۴/۴۷	۰	۰
دیازپام	۰/۱ mg/kg	۴۵/۵۸ ± ۲/۶۱	۹/۶۸±۰/۴۹***	۰	۰
	۰/۵ mg/kg	۱۲۱/۷۳±۴/۹۱***	۷/۹۰±۰/۵۲***	۰	۱۰۰/۰۰
	۱ mg/kg	۴۳۹/۶۱±۶۰/۸۰***	۴/۷۰±۱/۶۷ ***	۴۲/۸۰	۱۰۰/۰۰
	۱/۵ mg/kg	۵۸۷/۱۸±۱۲/۸۶***	۰/۷۱±۰/۷۱***	۸۵/۷۰	۱۰۰/۰۰
	۳ mg/kg	۶۰۰ ***	۰ ***	۱۰۰/۰۰	۱۰۰/۰۰
کربنوکسولون	۱۰۰ mg/kg	۲۱۳/۱۴ ± ۶۶/۵۹	۶/۳۵±۱/۵۵***	۱۴/۳۰	۵۷/۱۴
	۲۰۰ mg/kg	۳۸۸/۹۰ ± ۷۱/۷۴*	۳/۲۸±۱/۰۶***	۲۸/۶۰	۵۷/۱۴
	۳۰۰ mg/kg	۴۶۴/۸۶± ۶۶/۵۹**	۳/۰۰±۱/۹۱ ***	۵۷/۱۴	۲۸/۶۰

کربنوکسولون و دیازپام به ترتیب ۶۰ و ۳۰ دقیقه قبل از تجویز پنتیلن تترازول (۹۰ mg/kg, i.p.) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. داده‌ها به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد برای ۷ حیوان گزارش شد. *P< ۰/۰۵ و **P< ۰/۰۱، ***P< ۰/۰۰۱ آزمون Tukey-Kramer

دوز mg/kg ۰/۵ بود. بنابراین دوزهای بالاتر مورد آزمایش قرار نگرفت. محافظت از تشنج با افزایش دوز افزایش یافت اما محافظت در برابر مرگ و میر با افزایش دوز ایجاد نشد (جدول شماره ۱). در تشنج ناشی از الکتروشوک کربنوکسولون در دوز mg/kg ٤۰۰ توانست مدت زمان تشنج را کاهش دهد. محافظت در برابر تشنج در این دوز بیشتر از سایر دوزهای کربنوکسولون بود، لیکن محافظت در برابر مرگ و میر در این دوز کمتر از سایر دوزها بود (جدول شماره ۲).

مطالعات اثرات خواب‌آوری

کربنوکسولون در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با نرمال سالین با اختلاف معنی‌دار (P< ۰/۰۰۱) توانست مدت زمان خواب ناشی از پنتوباربیتال را افزایش دهد که این اثر وابسته به دوز است (جدول شماره ۳).

کربنوکسولون در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با نرمال سالین توانست نظیر دیازپام با دوز mg/kg ۱ زمان شروع خواب توسط پنتوباربیتال را با اختلاف معنی‌دار (P< ۰/۰۱) کاهش

جدول شماره ۲ – اثر کربنوکسولون بر روی مدت تشنج و محافظت در برابر مرگ و میر ناشی از الکتروشوک در موش سوری

درمان	دوز	مدت تشنج (ثانیه)	محافظت در برابر تشنج (درصد)	محافظت در برابر مرگ و میر (درصد)
نرمال سالین	۱۰ ml/kg	۱۷/۵۷ ± ۱/۷۲	۰	۱٤/۲۸
دیازپام	۰/۲۵ mg/kg	۱۱/۸۸ ± ۰/٤۸**	۰	۱۰۰/۰۰
	۰/۵ mg/kg	۸/٦۳ ± ۰/۲۱***	۰	۱۰۰/۰۰
	۳ mg/kg	٦/۰۱ ± ۱/۲۷ ***	۱٤/۳	۱۰۰/۰۰
کربنوکسولون	۱۰۰ mg/kg	۱۲/۱۱ ± ۲/۲۸	۱٤/۳	۸۵/۷۰
	۲۰۰ mg/kg	۱۲/۱۰ ± ۲/۰٤	۱٤/۳	۸۵/۷۰
	۳۰۰ mg/kg	۱۱/۸۵ ± ۱/٦۱	۱٤/۳	٦۰/۰۰
	٤۰۰ mg/kg	۹/۱٦ ± ۱/۷۱ *	۲۸/٦	۱٤/۲۸

کربنوکسولون و دیازپام به ترتیب ۶۰ و ۳۰ دقیقه قبل از اعمال تشنج الکتروشوک (mg/kg, i.p. ۹۰) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. داده‌ها به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد برای ۷ حیوان گزارش شد.

آزمون Tukey-Kramer *P< ۰/۰۵ و **P< ۰/۰۱، ***P< ۰/۰۰۱

جدول شماره ۳– اثر کربنوکسولون بر روی زمان شروع خواب و مدت زمان خواب ایجاد شده توسط پنتوباربیتال

درمان	دوز	زمان شروع خواب (دقیقه)	مدت زمان خواب (دقیقه)
نرمال سالین	۱۰ ml/kg	۷/۲۸ ± ۲/۰۹	۲۸/۰۱ ± ۱/۸۸
دیازپام	۱ mg/kg	٤/٦۷ ± ۰/٤۳**	٤۹/۱٦ ± ٤/٦۷***
کربنوکسولون	۱۰۰ mg/kg	٤/۳۳ ± ۰/۲۵**	٦۸/۵۵ ± ۵/۰٦***
	۲۰۰ mg/kg	٤/۲٤ ± ۰/۳۱ **	۷۵/۱۰ ± ۵/۰٦***
	۳۰۰ mg/kg	۳/٦۳ ± ۰/۳۸ ***	۹۳/۳۲ ± ۱٦/٤۹***

کربنوکسولون و دیازپام ۶۰ و ۳۰ دقیقه قبل از تجویز پنتوباربیتال (mg/kg i.p. ۳۰) به ترتیب تزریق شده است. داده‌ها به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد برای ۱۰ حیوان گزارش شده است.

آزمون Tukey-Kramer **P< ۰/۰۱، ***P< ۰/۰۰۱

دهد که این اثر وابسته به دوز بود. کربنوکسولون در دوز ۳۰۰ mg/kg توانست زمان شروع خواب را به طور قابل ملاحظه‌ای (P< ۰/۰۰۱) کاهش دهد که این اثر از دیازپام (۱ mg/kg) بیشتر بود.

مطالعه اثر شل‌کنندگی عضلانی

الف- مطالعه اثر شل‌کنندگی عضلانی به روش عدم گرفتن میله (Traction test)

نتایج به دست آمده از جدول شماره ٤ نشان می‌دهد که کربنوکسولون در دوزهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب سبب اثر شل‌کنندگی عضلانی به میزان ٦۰، ٤۰ و ۲۰ درصد نسبت به نرمال سالین گردید. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها با آزمون فیشر نشان داد که تنها کربنوکسولون با دوز ٤۰۰ mg/kg اختلاف معنی‌داری با نرمال سالین دارد.

دیازپام در دوزهای ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب شل‌کنندگی عضلانی به ترتیب ۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد گردید که دوزهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معنی‌داری با نرمال سالین نشان داد.

ب- مطالعه اثر شل‌کنندگی عضلانی و هماهنگی حرکتی عضلات به روش آزمون میله چرخان (Rotarod test)

با توجه به نتایج جدول شماره ۵ کربنوکسولون در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در آزمایش اول سبب کاهش مدت زمان باقی ماندن حیوان بر میله چرخان شتاب‌دار به صورت وابسته به دوز شد و این مدت زمان قابل مقایسه با کنترل منفی (نرمال سالین) بوده و از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۱).

این کاهش مدت زمان باقی ماندن حیوان بر میله چرخان شتاب‌دار در دوزهای ۲۰۰ mg/kg و ۳۰۰ مشابه دیازپام (۱ mg/kg) می‌باشد. در آزمایش دوم کربنوکسولون، در دوزهای ۲۰۰ mg/kg و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت معنی‌دار در مقایسه با نرمال سالین سبب کاهش مدت زمان باقی ماندن حیوان بر میله چرخان شتاب‌دار شد.

جدول شماره ۴ - مطالعه اثر شل‌کنندگی عضلانی کربنوکسولون در موش به روش عدم گرفتن میله (Traction test) با زمان ختم آزمایش ۵ ثانیه

درمان	دوز	درصد نگرفتن میله
نرمال سالین	۱۰ ml/kg	۰
دیازپام	۰/۱۲۵ mg/kg	۰
	۰/۲۵ mg/kg	۵۰*
	۰/۵ mg/kg	۱۰۰***
کربنوکسولون	۲۰۰ mg/kg	۲۰
	۳۰۰ mg/kg	٤۰
	٤۰۰ mg/kg	٦۰**

نتایج به صورت عدم گرفتن میله بیان شده است.

آزمون فیشر (دو طرفه)، مقایسه با کنترل (نرمال‌سالین) : ۰/۰۵ >*P، ۰/۰۱ >**P، ۰/۰۰۱ >***P ، n = ۱۰

جدول شماره ۵- مطالعه اثر شل‌کنندگی عضلانی کربنوکسولون در موش به روش آزمون میله چرخان شتاب‌دار (Accelerod test)

درمان	دوز	تریال اول (دقیقه)	تریال دوم (دقیقه)
نرمال سالین	۱۰ ml/kg	۳۰۰	۳۰
دیازپام	۱ mg/kg	۷/۶۰ ± ۱/۹۵ **	۲٤/۹٦ ± ۱۱/۷٤**
کربنوکسولون	۱۰۰ mg/kg	۱۸/۸۷ ± ٦/۵۷**	۲۲۱/۲۱ ± ۳۷/۵۵
	۲۰۰ mg/kg	۹/۷۸ ± ۱/٦۰**	۷۱/٤٤ ± ۳۸/۲۵**
	۳۰۰ mg/kg	۳/۵۵ ± ۱/۱۹**	۳۳/٤٦ ± ۲٦/٦٤**

کربنوکسولون و دیازپام ۶۰ و ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش به صورت ip تزریق شده است. داده‌ها به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد برای ۱۰ حیوان گزارش شده است. ۰/۰۰۱ >P**، آزمون دانت

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کربنوکسولون فعالیت ضدتشنجی در مدل‌های تشنجی پنتیلن تترازول و الکتروشوک دارد.

موادی که به صورت بالینی در صرع کوچک موثر هستند، اکثراً بر آزمون پنتیلن تترازول موثر هستند [۳۱]. بنابراین احتمالاً کربنوکسولون بر روی تشنج کوچک موثر است.

همچنین در آزمون الکتروشوک کربنوکسولون با دوز ٤۰۰ mg/kg توانست بر مهار کشش اندامهای عقبی حیوان موثر باشد بنابراین احتمالاً به صورت بالینی روی تشنج‌های عمومی و پیچیده نسبی موثر می‌باشد [۳۱].

در خصوص مکانیسم اثر ضدتشنجی، از آن جا که در شرایط برون‌تنی دیده شده که شروع تشنج و مدت زمان آن توسط کربنوکسولون (بلوک کانال‌های GJ) مهار شده است [۲۵]. همچنین مشتقات گلیسیریتینیک اسید و کربنوکسولون مستقیماً به مولکول کانکسین کانال GJ متصل شده و سبب تغییرات کنفورماسیونی در این کانال‌ها گشته و در نتیجه سبب بسته شدن این کانال‌ها می‌گردد [٦]. بنابراین کربنوکسولون بخشی از اثرات خود را از طریق بستن کانال‌های GJ اعمال کرده در نتیجه از هماهنگی غیرطبیعی میان نورون‌های مغز جلوگیری می‌کند که منجر به تاخیر در شروع حملات تشنجی در آزمون پنتیلن تترازول می‌شود. از طرفی بسته شدن این کانال‌ها می‌تواند از طولانی شدن حملات تشنجی در آزمون پنتیلن تترازول و الکتروشوک جلوگیری کند.

نتایج آزمون خواب‌آوری نشان می‌دهد که کربنوکسولون دارای اثر خواب‌آوری است و در خصوص مکانیسم اثر آن از آنجا که گلیسیریتینک اسید- مشتق آگلیکونی glycyrrhizic acid (از ریشه گیاه شیرین بیان)- ساپونینی می‌باشد [۲۵] و چون ساپونین‌ها دارای اثر خواب‌آوری هستند [۱۲] و از طرفی کربنوکسولون مشتق صناعی گلیسیریتینیک اسید می‌باشد، احتمال دارد این اثر قابل توجه خواب‌آوری به ساختمان ساپونینی دارو برگردد.

از مجموع نتایج آزمون شل‌کنندگی عضلانی چنین برمی‌آید که کربنوکسولون دارای اثرات شل‌کنندگی عضلانی است و درخصوص مکانیسم این اثر باید در نظر داشت که ایجاد هماهنگی در گسترش تحریکات میان نورون‌ها پدیده‌ای است که در مغز پستانداران [۸، ۳۰] از جمله کورتکس حرکتی [۲]، نورون‌های حرکتی تنفسی [۳، ۱٦] و نورون‌های اندام‌های حرکتی

[۷، ۱۱] دیده شده است و در مطالعاتی که به تازگی انجام پذیرفته نقش این کانال‌ها به طور مستقیم نشان داده شده است. بنابراین Gap junction coupling توانایی هماهنگ‌سازی قدرتمندی را حتی در غیاب سیناپس‌های شیمیایی فراهم می‌سازد و رفتارهای حرکتی را از طریق هماهنگ‌سازی نورون‌های حرکتی واسطه‌گری می‌کند [۱۵]. لیکن با وجود افزایش مطالعات در خصوص حضور و عملکرد کانال‌های GJ، کسب اطلاعات کامل در خصوص نقش این کانال‌ها در عملکرد حرکتی که هنوز نامشخص است ضرورت دارد.

از سوی دیگر در مطالعات انجام گرفته، نقش سیستم گاباارژیک، در تنظیم فعالیت کانال‌های GJ در هسته‌های سوپر اکیاسماتیک رت در کشت سلولی مشخص شده است به گونه‌ای که ماسیمول وابسته به دوز می‌تواند سبب بسته شدن این کانال‌ها و جلوگیری از انتقال امواج دپولاریزاسیون میان این کانال‌ها گردد. مکانیسم احتمالی برای چگونگی تاثیر سیستم گاباارژیک دخالت بر غلظت کلسیم و pH داخل سلولی می‌باشد [۲۷].

بنابراین با توجه به مطالعات نشان داده شده،

احتمالاً کربنوکسولون از طریق بستن کانال‌های GJ به گونه‌ای عملکرد سیستم گاباارژیک را تقویت کرده و همین امر می‌تواند توجیهی برای اثرات ضدتشنجی، شل‌کنندگی عضلانی و حتی اثر خواب‌آوری این دارو باشد.

نتیجه نهایی آنکه کربنوکسولون فعالیت ضدتشنجی در آزمون‌های پنتیلن تترازول و الکتروشوک دارد. همچنین دارای اثرات خواب‌آوری و شل‌کنندگی عضلانی بوده و این اثرات به صورت وابسته به دوز می‌باشد و این دو ویژگی می‌تواند در کنترل بیماری صرع، خصوصاً در درمان صرع‌های مقاوم نقش کمکی قابل ملاحظه‌ای را ایجاد کند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بر اساس طرح پژوهشی تایید شده توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد صورت گرفته است. بدین‌وسیله از این معاونت قدردانی می شود.

منابع

1. Baba M, Shigeta S. Antiviral activity of glycyrrhizin against varicella-zoster virus in vitro. *Antiviral Res.* 1987; 7: 99-107.

2. Baker SN. The role of synchrony and osillations in the motor out put. Exp. Brain. Res. 1999; 128: 109-17.

3. Bou-Flores C and Berger AJ. Gap junctions and inhibitory synapses modulate inspiratory motoneuron synchronization. *J Neurophsiol.* 2001; 85: 1543-51.

4. Carlen PL, Skinner F, Zhang H, Naus C, Kushnir M, Velazquez JLP. The role of gap junctions in seizures. *Brain Res. Rev.* 2000; 32: 235-41.

5. Dandiya PC, collumbine H. Studies on *Acorus calamus* (III): some pharmacological actions of the volatile oil. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1959; 125: 353-9.

6. Davidson JS, Baumgarte IM. Glycyrrhetinic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication: structure-activity relationships. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; 246: 11,4-7.

7. De Luca. Synchronization of motor-unit firings in several human muscles. *J. Neurophysiol.* 1993; 70: 2010-23.

8. Engel AK and Singer W. Temporal binding and correlates of sensory awareness. *Trends Cognit.* 2001; 5: 6-25.

9. Gladwell SJ, Jefferys JGR. Electronic ectopic action potential in the 4-aminopyridine

acute model of epilepsy in the hippocampal slice. *J. Physiolog* 2000; 253: 194.

10. Haraguchi H, Ishikawa H, Mizutani K. Antioxidative and superoxide scavenging activites of retrochalcones in *Glycyrrhiza Inflata*. *Bioorg. Med. Chem.* 1998; 6: 339-47.

11. Huesler EJ. EMG activation pattern during force production in precision grip. III. Synchronization of single motor units. *Exp. Brain Res.* 2000; 134: 441-55.

12. Hussain MM, Sokomba EN and Shok M. Pharmacological effects of *Gardenia erubescens* in mice, rats and cats. *Int. J. Pharmacogn.* 1991; 29: 94-100.

13. Jellinck PH, Monder C, McEwen BS, Sakai RR. Differential inhibition of 11-beta-hydroxy steroid dehydrogenase by carbenoxolone in rat brain regions and peripheral tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993; 46: 209-13.

14. Jun R, Zhengang W. Pharmacological research on the effect of licorice. *J. Tradit. Chin. Med.* 1988; 8: 307-9.

15. Kiehn O, Tresch MC. Gap junctions and motor behavior. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 108-15.

16. Kirkwood PA. Variations in the time course of the synchronization of intercostal motoneurones in the cat. *J. Physiol.* 1982; 327: 105-35.

17. Kroes BH, Beukelman CJ, Berg AJ, Wolbink GJ. Inhibition of human complement by beta glycyrrhetinic acid. *Immunol* 1997; 90: 115-20

18. Leung A. *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food Drugs and Cosmetics*. John Wiley and Sons, New York, NY, 1980; pp: 220-3.

19. Mcilwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, Paylor R. The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol. Behav.* 2001; 73: 705-17.

20. Moon A, Kim SH. Effect of *Glycyrrhiza glabra* roots and glycyrrhizin on the glucuronidation in rats. *Planta Med*. 1997; 63: 115-9.

21. Nagayama S, Jono H, Suzaki H, Sakai K, Tsuruya E, Yamatsu I, Isohama Y, Miyata T, Kai H. Carbenoxolone, a new inducer of heat shock protein 70. *Life Sci.* 2001; 69: 2867-73.

22. Ody P. *The complete Medicinal Herbal.* Dorling Kindersley LTd, London 1993; 65.

23. Pompei R, Flore O, Marccialis MA. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature* 1979; 281: 689-90.

24. Pompei R, Pani A, Flore O. *Antiviral activity glycyrrhizic acid. Experientia.* Raven Press, New York, 1980; pp.285-97.

25. Ross FM, Gwyn P, Spanswick D, Davies SN. Carbenoxolone depresses spontaneous epileptifrom activity in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neurosci.* 2000; 100: 789-96.

26. Rudzic AD, Hester JB, Tang AH, Stow RN and Friis W. The benzodiazepines, *Neurosci.* 1999; 3: 591-6.

27. Shinohara K, Hiruma H, Funabashi T and Kimura F. Gabaergic modulation of gap junction communication in slice cultures of the rat superachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* 1999; 3: 591-6.

28. Traub RD, Whittington MA, Buhl EH, Lebeav FEN, Bibbig A, Boyd S, Cross H, Baldeweg T. A Possible role for gap junctions in generation of very fast EEG oscillations preceding the onset of, and perhaps initiating seizures. *Epilepsia.* 2001; 42: 153-70.

29. Turpie AG, Thomson TJ. Carbenoxolone sodium in the treatment of gastric ulcer with special reference to side effects. *Gut* 1965; 6: 591-4.

30. Usrey WM, Reid RC. Synchronous activity in the visual system. *Annu. Rev. Physiol.* 1999; 61: 435-56.

31. Vida JA. Anticonvulsants. In: Foye WO, Lemke TL, Williams DA, eds. *Principles of*

Medicinal chemistry. 4th ed. London: Williams and Wilkins; 1995.

32. Vogel HG and Vogel WH. *Drug Discovery and Evaluation, Pharmacological Assay*. Springer, Berlin, 1997; pp: 260-261, 267

33. Wang GS, Han ZW. The protective action of Glycyrrhiza flavonoids against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. *Yao. Hsueh. Pao.* 1993; 28: 572-6.